


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>4</sup> :  C12Q 1/28, G01N 33/535	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 04328  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Juni 1988 (16.06.88)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE87/00583  (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Dezember 1987 (08.12.87)  (31) Prioritätsaktenzeichen: P 36 41 830.7 (32) Prioritätsdatum: 8. Dezember 1986 (08.12.86) (33) Prioritätsland: DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstraße 54, D-8000 München 19 (DE).  (72) Erfinder;und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BRYNICK, Dieter [DE/DE]; Wilhelm-Werter-Str. 13, D-7409 Dusslingen (DE). TRICK, Iris [DE/DE]; Waldrennacher Steige 24, D-7540 Neuenburg (DE). TRÖSCH, Walter [DE/DE]; Egerweg 35, D-7000 Stuttgart 61 (DE).	(74) Anwalt: PATENTSTELLE FÜR DIE DEUTSCHE FORSCHUNG DER FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT; Leonrodstraße 68, D-8000 München 19 (DE).  (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  Veröffentlicht  Mit internationalem Recherchenbericht Mit geänderten Ansprüchen und Erklärung  Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche und Erklärung: 14. Juli 1988 (14.07.88)	
(54) Title: IMMUNOLOGICAL ENZYMATIC TEST WITH DETECTION BY COLOR CHANGES IN THE VISIBLE SPECTRUM  (54) Bezeichnung: IMMUNENZYMATISCHER TEST MIT DETEKTION DURCH FARBUMSCHLAG IM SICHTBAREN SPEKTRALBEREICH  (57) Abstract  In an immunological enzymatic test with detection by color changes in the visible spectrum, the dyestuff concentration is only of the order of magnitude of the substrate turnover. Depending on the concentration of antigens or antibodies, reaction products having different colours are produced, so that the quantitative determination of the antigen or antibody can be effected by comparing the coloured reaction product with reference colours.  (57) Zusammenfassung  Immunenzymatischer Test mit Detektion durch Farbumschlag im sichtbaren Spektralbereich. Die Farbstoffkonzentration liegt nur in der Größenordnung des Substratumsatzes und in Abhängigkeit der Antigen- bzw. Antikörperkonzentration entstehen unterschiedlich gefärbte Reaktionsprodukte, so dass die quantitative Bestimmung des Antigens bzw. Antikörpers durch einen Vergleich der farbigen Reaktionsprodukte mit Referenzfarben erfolgen kann.		

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LÜ	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

## GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 20. Juni 1988 (20.06.88) eingegangen;  
neuer Anspruch 9 aufgeführt (1 Seite)]

gekoppelten System mit Peroxidase verwendet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1 - 6,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß als Farbstoff ein Redoxindikator verwendet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß als Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin verwendet wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur immunenzymatischen Bestimmung von Antigenen mit einem ersten Antikörper oder von Antikörpern mit einem zweiten Antikörper und einem an den ersten bzw. zweiten Antikörper kovalent gebundenen Indikatorenzym mittels eines Farbstoffes, indem eine Farbreaktion mit dem Indikatorenzym durchgeführt wird,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß ein Farbstoff verwendet wird, der unterschiedlich gefärbte Reaktionsprodukte zu bilden vermag, die Farbstoffkonzentration nur in der Größenordnung des Substratumsatzes gehalten wird, so daß in Abhängigkeit der Antigen- bzw. Antikörperkonzentration unterschiedlich gefärbte Reaktionsprodukte entstehen, und daß zur Variation des Meßbereiches die Farbstoffkonzentration so gewählt wird, daß der Farbumschlag zur Detektion ausnützbar ist, indem die quantitative Bestimmung des Antigens bzw. Antikörpers durch einen Vergleich der farbigen Reaktionsprodukte mit Referenzfarben erfolgt.

**IN ARTIKEL 19 GENANNT ERKLÄRUNG**

Der neue Anspruch 9 stützt sich auf die Offenbarung des ursprünglichen Anspruches 1 in Verbindung mit der Beschreibung (Seite 7, Abs. 2, Mitte).

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>4</sup> :  C12Q 1/28, G01N 33/535</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 04328  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Juni 1988 (16.06.88)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE87/00583 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Dezember 1987 (08.12.87)  (31) Prioritätsaktenzeichen: P 36 41 830.7 (32) Prioritätsdatum: 8. Dezember 1986 (08.12.86) (33) Prioritätsland: DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDE- RUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstraße 54, D-8000 München 19 (DE).  (72) Erfinder;und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BRYNICK, Dieter [DE/DE]; Wilhelm-Werter-Str. 13, D-7409 Dusslingen (DE). TRICK, Iris [DE/DE]; Waldrennacher Steige 24, D-7540 Neuenburg (DE). TRÖSCH, Walter [DE/ DE]; Egerweg 35, D-7000 Stuttgart 61 (DE).</p>		<p>(74) Anwalt: PATENTSTELLE FÜR DIE DEUTSCHE FORSCHUNG DER FRAUNHOFER-GESELL- SCHAFT; Leonrodstraße 68, D-8000 München 19 (DE).  (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (eu- ropäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelas- senen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Än- derungen eintreffen.</p>
<p>(54) Title: IMMUNOLOGICAL ENZYMATIC TEST WITH DETECTION BY COLOR CHANGES IN THE VISIBLE SPECTRUM  (54) Bezeichnung: IMMUNENZYMATISCHER TEST MIT DETEKTION DURCH FARBUMSCHLAG IM SICHT- BAREN SPEKTRALBEREICH  (57) Abstract  In an immunological enzymatic test with detection by color changes in the visible spectrum, the dyestuff concentra- tion is only of the order of magnitude of the substrate turnover. Depending on the concentration of antigens or antibodies, reaction products having different colours are produced, so that the quantitative determination of the antigen or antibody can be effected by comparing the coloured reaction product with reference colours.  (57) Zusammenfassung  Immunezymatischer Test mit Detektion durch Farbumschlag im sichtbaren Spektralbereich. Die Farbstoffkonzent- ration liegt nur in der Größenordnung des Substratumsatzes und in Abhängigkeit der Antigen- bzw. Antikörperkonzent- ration entstehen unterschiedlich gefärbte Reaktionsprodukte, so dass die quantitative Bestimmung des Antigens bzw. An- tikörpers durch einen Vergleich der farbigen Reaktionsprodukte mit Referenzfarben erfolgen kann.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

## Immunoenzymatischer Test mit Detektion durch Farbumschlag im sichtbaren Spektralbereich

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur immuno-enzymatischen Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern mit Detektion durch Farbumschlag in sichtbarem Spektralbereich.

Die enzymatische Analyse ist vor allem dank der Spezifität und Geschwindigkeit eine gegenüber den herkömmlichen überlegene Analysenmethode. Eine der wichtigsten Varianten der enzymatischen Analyse für die Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern ist der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Der ELISA in seiner einfachsten Form dient zum Nachweis einer beliebigen Substanz (Antigen), gegen die Antikörper verfügbar sind. Das nachzuweisende Antigen wird dabei an eine feste Oberfläche adsorbiert. Danach wird das fixierte Antigen mit Antikörpern markiert, die zuvor kovalent an ein Indikatorenzym gebunden wurden. Nach dem Auswaschen der überschüssigen Antikörper wird das Enzym durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Durch die Konzentration des gebildeten farbigen Reaktionsproduktes kann auf die Konzentration des Antigens zurückgeschlossen werden. In analoger Weise ist die Bestimmung von Antikörpern mit einem zweiten Antikörper möglich.

Es ist bekannt, daß diese "colorometrischen ELISAS" vor allem mit drei Enzymen durchgeführt werden: alkalische Phosphatase mit p-nitrophenylphosphat als Substrat,  $\beta$ -Galactosidase mit o-Phenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid und Peroxidase mit verschiedenen Farbsubstraten. Die quantitative Messung erfolgt bei allen ELISAS durch

- 2 -

Bestimmung der Konzentration des farbigen Reaktionsproduktes, das aus dem Enzym und dem zuerst farblosen Substrat gebildet wird.

Bei diesen bekannten Methoden wird jedoch ein hoher Substratüberschuß verwendet, der in der Regel um den Faktor 10 über dem des tatsächlichen Substratumsatzes liegt. Dadurch soll erreicht werden, daß das Enzym mit max. Umsatzgeschwindigkeit arbeitet, was die Empfindlichkeit und Schnelligkeit des Testes anheben soll. Durch diese Maßnahme wird jedoch ein farbiges Reaktionsprodukt gebildet, dessen quantitative Bestimmung nur durch eine aufwendige und zeitraubende photometrische Analyse erfolgen kann, die zudem von ausgebildetem Personal ausgeführt werden muß.

Eine einfache, billige und schnelle Analyse ohne Laborausrüstung ist demnach nicht möglich. Aus der Druckschrift von H. Gallati und I. Pracht (J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460) ist z. B. bekannt, daß für ELISAS, für die 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat für Peroxidase verwendet wird, 1 µmol/ml TMB eingesetzt wird.

Eine ähnliche Bestimmungsmethode wird von E. Bos und A. van der Doelen et. al. (J. Immunoassay 2, 187-204) beschrieben. Hier werden 420 nmol/ml TMB verwendet.

In beiden Fällen wird das stabile bläuefärbte 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Radikalkation erhalten, der Farbumschlag zum gelben 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-Diphenochinon-4,4'-Diimmoniumion wird bedingt durch den vorhandenen großen Substratüberschuß nicht erreicht. Es wird somit nur ein farbiges Reaktions-



- 3 -

produkt angehäuft, unabhängig vom Antigen- bzw. Antikörperumsatz. Analoges gilt für die Bestimmungsmethode bei der durch Abstopfung mit Säure dann nur das gelbe Reaktionsprodukt erhalten wird. Die quantitative Auswertung erfolgt durch eine aufwendige photometrische Analyse.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, eine quantitative, einfache, billige und schnelle immunenzymatische Bestimmungsmethode zur Verfügung zu stellen. Die Analysenmethode soll weiterhin von einer Laborausrüstung unabhängig sein.

Die Erfindung wird durch die kennzeichnenden Merkmale der Ansprüche gelöst.

Die erfind. Lösung zeigt, daß mit der Senkung der Farbstoffkonzentration in die Größenordnung des Substratumsatzes die je nach Antigen- bzw. Antikörperumsatz unterschiedlich gefärbten Reaktionsprodukte zur einfachen und schnellen sowie genauen quantitativen Bestimmung dienen können.

Anhand des ELISA, für den TMB als Substrat für Peroxidasen verwendet wird, soll die Erfindung näher erläutert werden. TMB wird dabei als Peroxidasesubstrat zunächst zum Zwischenprodukt, denn Tetramethylbenzidin-Radikalkation oxidiert, das mit einem Ladungsaustauschkomplex im Gleichgewicht steht. Dieses Zwischenprodukt ist blau und hat zwei Adsorptionsmaxima bei 370 nm und 650 nm. Wird mehr H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt als der halben molaren Konzentration TMB entspricht, wird das Radikalkation weiter oxidiert zum Endprodukt dem 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion, das bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm gelb ist. Optisch vollzieht sich dieser Teil der Reaktion als ein kontinuierlicher Wechsel der Farbe der Lösung von blau

- 4 -

über grüne Zwischentöne nach gelb. Die Erfindung ermöglicht, daß das auf Farbunterschiede sehr empfindlich reagierende menschliche Auge, die je nach Antigen- bzw. Antikörperumsatz unterschiedlich gefärbten Reaktionsprodukte durch Vergleich mit Referenzfarben schnell und quantitativ auswerten kann.

Im herkömmlichen ELISA; der mit Peroxidase und TMB als Substrat durchgeführt wird, werden an der oberen Grenze des Meßbereichs ca. 50 nmol  $H_2O_2$ /ml (äquivalent zum Substratumsatz) umgesetzt; d. h. der Meßbereich des ELISA's in Photometer umfaßt den Umsatz von 0-50 nmol  $H_2O_2$ /ml. Bei einer Auswertung des Tests kann eine weitere Akkumulation des blauen Zwischenproduktes bis ca. 100 nmol/ml erkannt werden. Wird der Farbumschlag zur Detektion ausgenützt, kann durch die Wahl der Farbstoffkonzentration der Meßbereich stark variiert werden. Die obere Grenze des Meßbereichs wird durch die TMB-Konzentration festgelegt. Wird der Test mit Glucose-Oxidase und Peroxidase im gekoppelten Enzymsystem durchgeführt, liegt die max. Obergrenze bedingt durch die Löslichkeit des Sauerstoffs bei 250 nmol/ml. Wird die TMB-Konzentration gesenkt, kann der Farbumschlag bei niedrigeren  $H_2O_2$ -Umsatz erreicht werden, wodurch auch sehr niedrige Konzentrationen des zu bestimmenden Antigens genau quantifiziert werden

können. Die Untergrenze wird durch die Wahrnehmbarkeit des Farbstoffes mit dem bloßen Auge definiert und liegt bei 10 nmol/ml. Der Test ist also sehr variabel und kann je nach Anwendung auf hohe Empfindlichkeit oder großen Meßbereich ausgelegt werden.

Zur Durchführung bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten:

- a) Als Enzym wird Peroxidase verwendet, als Farbsubstrat TMB. Die Konzentration des TMB wird dabei so gewählt, daß sie der oberen Grenze des Meßbereiches entspricht. Dadurch ändert sich mit zunehmender Enzymkonzentration und entsprechend zunehmenden  $H_2O_2$ -Umsatz nicht nur die Konzentration eines farbigen Produktes, sondern auch das Verhältnis zweier unterschiedlich gefärbter Produkte und dadurch die spektrale Zusammensetzung der zu betrachtenden Farbe.
- b) In der zweiten Version werden Glucose-Oxidase markierte Antikörper verwendet. Glucose-Oxidase setzt Glucose, die in optimaler Konzentration eingesetzt werden kann, mit Sauerstoff zu Gluconsäure um, wobei  $H_2O_2$  als Nebenprodukt entsteht, dessen Konzentration mit TMB und Peroxidase bestimmt wird. Dabei kann die Peroxidase in so hohen Konzentrationen eingesetzt werden, daß das  $H_2O_2$  innerhalb weniger Minuten quantitativ umgesetzt wird. Durch den entstehenden Farbton kann also die gebildete  $H_2O_2$ -Konzentration und damit die Menge der gebundenen Glucose-Oxidase und die Konzentration des nachzuweisenden Antigens bestimmt werden.

Der Test läßt sich prinzipiell zum Nachweis von Antikörpern und allen Substanzen verwenden, für die Antisera verfügbar sind; beispielsweise zum Nachweis von Bakterien und Viren in der Biotechnologie, Lebensmittelanalytik, Hygiene, Medizin und Umwelt, aber auch zum Nachweis von verschiedenen Giften, Hormonen, Pharmaka, etc. Sinnvolle Anwendung findet er überall, wo es gilt, schnell und ohne Laborausstattung quantitative Bestimmungen durchzuführen. Die Erfindung wird anhand einiger Beispiele näher erläutert.

#### 1. Biotechnologie

Die Probe aus dem Reaktor wird mit zuvor immobilisierten Antikörpern gegen den spezifischen Stamm inkubiert. Die Bakterien dieses Stammes werden gebunden, die anderen werden ebenso wie alle übrigen Substanzen aus der Probe ausgewaschen. Die gebundenen Bakterien werden mit Glucose-Oxidase konjugierten Antikörpern markiert. Die Glucose-Oxidase wird durch den Substratpuffer nachgewiesen, der Glucose, Peroxidase und TMB enthält. Nach festgelegten Reaktionszeiten werden Proben entnommen und nach wenigen Minuten, nach Abschluß der Peroxidase-Reaktion mit Referenzfarben verglichen und damit die Konzentration des spezifischen Bakterienstammes bestimmt.

#### 2. Cholesterinspiegel

Die Arteriosklerose, mit ihren gefährlichen Folgen, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, die häufigste Todesursache in der westlichen Welt, ist auf Einlagerungen von Cholesterin in Gefäßwänden zurückzuführen, das aus LDL (low density lipoprotein)-Partikeln im Blut stammt. Der LDL-Spiegel ist direkt mit dem Risiko einer Arteriosklerose korreliert. Die Risikoabschätzung ist also durch

- 7 -

Bestimmung des LDL-Spiegels möglich. Die Bestimmung kann durchgeführt werden mit Hilfe enzymmarkierter Antikörper gegen Cholesterin oder Apoprotein B-100, dem Protein in LDL-Partikeln, das durch LDL-Rezeptoren in der Membran tierischer Zellen spezifisch erkannt wird.

3. Nachweis von Pharmaka, Beispiel: Herzglycoside  
Herzwirksame Glycoside werden zur Therapie der Herzinsuffizienz verwendet, um Schlagvolumen und Minutenvolumen des Herzens zu steigern. Die Dosierung der Herzglycoside muß individuell bestimmt werden und sehr genau erfolgen. Man unterscheidet die Sättigungsdosis, die zum Erreichen der gewünschten Wirkung verabreicht werden muß, und die Erhaltungsdosis, die zur Erhaltung des Vollwirkspiegels nötig ist. Die Erhaltungsdosis hängt von der Resorptions- und Abklingquote des einzelnen Glycosides beim einzelnen Patienten ab. Es wird vermutet, daß ca. 20 % der mit Herzglycosiden behandelten Patienten an einer Überdosierung dieser Glycoside sterben.

Die Serumkonzentration und damit die Resorptions- und Abklingquote lassen sich durch diesen Test mit Hilfe GOD-markierter Antikörper gegen Herzglycoside schnell und exakt in jeder Arztpraxis bestimmen.

4. Nachweis von Hormonen, Beispiel: lutensisierendes Hormon (LH)

Zum Zeitpunkt der Ovulation steigt der LH-Spiegel im Serum der Frau steil an und bleibt ca. 24 Stunden bestehen, um wieder ebenso rasch abzufallen. Im Rahmen ärztlicher Hilfe bei unerfülltem Kinderwunsch kann die betroffene Frau mit einem immunenzymatischen Nachweis

von LH im Urin den exakten Zeitpunkt des Eisprungs selbst bestimmen. Im Gegensatz zum Schwangerschaftstest durch immunologischen  $\beta$ -HCG-Nachweis muß dieser Test quantitativ sein, da der Zeitpunkt des LH-Konzentrationsmaximums dem Ovulationszeitpunkt entspricht.

5. Nachweis von Antikörpern, Beispiel: Allergietest  
Charakteristisch für Allergien ist die Bildung von IgE-Antikörpern, die spezifisch gegen das betreffende Allergen gerichtet sind. Ein einfacher immunenzymatischer Allergietest kann durchgeführt werden, indem die infrage kommenden Allergene jeweils an eine feste Oberfläche gebunden werden und mit einer Serumprobe des Patienten inkubiert werden. IgE-Antikörper, die an das Allergen gebunden wurden, lassen sich durch enzymmarkierte Anti-Human-IgE-Antikörper nachweisen. Eine starke Enzymkonzentration kennzeichnet das Allergen, gegen das der Patient sensibilisiert ist. Ein solcher immunenzymatischer Allergietest ist völlig risikofrei und für den Patienten wesentlich angenehmer als der herkömmliche Allergietest, bei dem durch subcutane Applikation der Allergene eine allergische Hautreaktion erzeugt wird.

## P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur immunenzymatischen Bestimmung von Antigenen mit einem ersten Antikörper oder von Antikörpern mit einem zweiten Antikörper und einem an den ersten bzw. zweiten Antikörper kovalent gebundenen Indikatorenzym mittels eines Farbstoffes, indem eine Farbreaktion mit dem Indikatorenzym durchgeführt wird,

d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß die Farbstoffkonzentration nur in der Größenordnung des Substratumsatzes liegt und daß in Abhängigkeit der Antigen- bzw. Antikörperkonzentration unterschiedlich gefärbte Reaktionsprodukte entstehen, so daß die quantitative Bestimmung des Antigens bzw. Antikörpers durch einen Vergleich der farbigen Reaktionsprodukte mit Referenzfarben erfolgt.

- 10 -

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,  
daß bevorzugt eine Farbstoffkonzentration im  
Bereich von 10 bis 100 nmol/ml verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 - 2,

dadurch gekennzeichnet,  
daß eine Farbstoffkonzentration im Bereich von  
10 bis 250 nmol/ml verwendet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 - 3,

dadurch gekennzeichnet,  
daß als Indikatorenzym Peroxidase verwendet  
wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 - 3,

dadurch gekennzeichnet,  
daß als Indikatorenzym eine Oxidase in einem  
gekoppelten System mit Peroxidase verwendet  
wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1 - 3,

dadurch gekennzeichnet,  
daß als Indikatorenzym Glucose-Oxidase in einem



- 11 -

gekoppelten System mit Peroxidase verwendet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1 - 6,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß als Farbstoff ein Redoxindikator verwendet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß als Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin  
verwendet wird.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 87/00583

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>4</sup> : C 12 Q 1/28; G 01 N 33/535		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>4</sup>	C 12 Q; G 01 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT<sup>8</sup></b>		
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	FR, A, 2449882 (BOEHRINGER MANNHEIM) 19 September 1980, see page 4, lines 10-39; pages 6-7; example 1; claims	1-4
P,X	EP, A, 0224210 (BEHRINGWERKE AG) 3 June 1987, see pages 3-10	1,3,4-8
X	US, A, 4503143 (B. GERBER et al.) 5 March 1985, see columns 6-12; examples 1,2	1-8
A	Clinical Chemistry, volume 28, No. 4, April 1982, (Washington, US) R.H. White-Stevens: "Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury", pages 578-588, see page 579, column 2, lines 20-38	1-4
A	WO, A, 85/05688 (TRAVENOL-GENETECH DIAGNOSTICS) 19 December 1986, see the whole document	1-8
A	WO, A, 86/05207 (BOOTS CELLTECH DIAGNOSTICS)	1-8
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
14 March 1988 (14.03.88)	21 April 1988 (21.04.88)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	12. September 1986, see the whole document  -----	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

DE 8700583

SA 19744

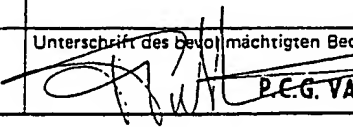
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 13/04/88  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2449882	19-09-80	DE-B- 2906732	28-08-80
		GB-A, B 2044927	22-10-80
		JP-A- 55118398	11-09-80
		US-A- 4302537	24-11-81
		CA-A- 1134744	02-11-82
		CH-B- 651318	13-09-85
EP-A- 0224210	03-06-87	AU-A- 6578086	04-06-87
		JP-A- 62134100	17-06-87
		DE-A- 3541978	04-06-87
US-A- 4503143	05-03-85	Keine	
WO-A- 8505688	19-12-85	EP-A- 0185057	25-06-86
		US-A- 4596770	24-06-86
		JP-T- 62500882	09-04-87
WO-A- 8605207	12-09-86	AU-A- 5580986	24-09-86
		EP-A- 0214262	18-03-87
		GB-A- 2182145	07-05-87
		JP-T- 62502100	20-08-87

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 87/00583

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben; <sup>6</sup> )		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int. Cl. <sup>4</sup> C 12 Q 1/28; G 01 N 33/535		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Cl. <sup>4</sup>	C 12 Q; G 01 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN <sup>9</sup>		
Art <sup>*</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	FR, A, 2449882 (BOEHRINGER MANNHEIM) 19. September 1980, siehe Seite 4, Zeilen 10-39; Seiten 6-7; Beispiel 1; Ansprüche	1-4
P, X	EP, A, 0224210 (BEHRINGWERKE AG) 3. Juni 1987, siehe Seiten 3-10	1, 3, 4-8
X	US, A, 4503143 (B. GERBER et al.) 5. März 1985, siehe Spalten 6-12; Beispiele 1, 2	1-8
A	Clinical Chemistry, Band 28, Nr. 4, April 1982, (Washington, US) R.H. White-Stevens: "Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury", Seiten 578-588, siehe Seite 579, Spalte 2, Zeilen 20-38	1-4
A	WO, A, 85/05688 (TRAVENOL-GENETECH DIAGNOSTICS) 19. Dezember 1986, ./. .	1-8
<p><sup>*</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
14. März 1988		21 APR 1988
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des Bevollmächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt		 P.C.G. VAN DER PUTTEN

## III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	siehe das ganze Dokument -- WO, A, 86/05207 (BOOTS CELLTECH DIAGNOSTICS) 12. September 1986, siehe das ganze Dokument  -----	1-8

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

DE 8700583

SA 19744

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 13/04/88

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-A- 2449882	19-09-80	DE-B- 2906732	28-08-80
		GB-A, B 2044927	22-10-80
		JP-A- 55118398	11-09-80
		US-A- 4302537	24-11-81
		CA-A- 1134744	02-11-82
		CH-B- 651318	13-09-85
-----			
EP-A- 0224210	03-06-87	AU-A- 6578086	04-06-87
		JP-A- 62134100	17-06-87
		DE-A- 3541978	04-06-87
-----			
US-A- 4503143	05-03-85	Keine	
-----			
WO-A- 8505688	19-12-85	EP-A- 0185057	25-06-86
		US-A- 4596770	24-06-86
		JP-T- 62500882	09-04-87
-----			
WO-A- 8605207	12-09-86	AU-A- 5580986	24-09-86
		EP-A- 0214262	18-03-87
		GB-A- 2182145	07-05-87
		JP-T- 62502100	20-08-87
-----			

EPO FORM P0073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82